



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **11286499 A**(43) Date of publication of application: **19.10.99**

(51) Int. Cl.

**C07K 16/12**  
**C12N 5/10**  
**C12N 15/02**  
**C12P 21/08**  
**G01N 33/569**  
**G01N 33/577**  
**/(C12N 5/10 , C12R 1:91 )**

(21) Application number: **10101887**(22) Date of filing: **31.03.98**(71) Applicant: **TECHNOL RES ASSOC OF  
MEDICAL & WELFARE  
APPARATUS**(72) Inventor: **SHIRAKAWA TAKASHI  
TAKEMURA FUMINORI  
MATSUI TOSHIO  
UENO HIDEKAZU  
ITO SATORU**

(54) **MONOCLONAL ANTIBODY RECOGNIZING  
PATHOGENIC ESCHERICHIA COLI, HYBRIDOMA  
PRODUCING THE MONOCLONAL ANTIBODY  
AND DETECTION OF PATHOGENIC  
ESCHERICHIA COLI BY USING THE  
MONOCLONAL ANTIBODY**

(57) Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a new monoclonal antibody capable of directly recognizing pathogenic Escherichia coli and useful for measurement of the pathogenic Escherichia coli by an immunity measuring method.

**SOLUTION:** This new monoclonal antibody is the one capable of recognizing a pathogenic Escherichia coli, preferably enterohemorrhagic Escherichia coli producing vero toxin (e.g. pathogenic Escherichia coli O-157), and further preferably recognizing intimin, preferably

intn202 or the like. The monoclonal antibody is obtained by administering the intimin or the like of a pathogenic Escherichia coli as an immunogen singly or with an adjuvant to a mouse or the like to immunize the mouse or the like, fusing an antibody-producing cells such as spleen cells of the immunized mouse or the like with tumor cells such as myeloma cells to provide hybridomas, selecting the fused hybridomas by a selective medium, forming the selected hybridomas into the monoclonal ones by a limiting dilution technique, cultivating the monoclonal hybridomas, selecting the clone producing the objective monoclonal antibody from the cultivation supernatant fluid by an immunoassay such as an enzymeimmunoassay, further administering the selected clone to a pristane-treated mouse, gathering ascites of the mouse to purify the objective antibody.

COPYRIGHT: (C)1999,JPO



化ナトリウムを含むカラム平衡化緩衝液で溶出したところで約0.3M塩化ナトリウム溶出画分にインティミンNpを回収した。セントリプレッ10（アミコン社製）で濃縮を行ったQFF溶出画分を6M尿素、0.5M塩化ナトリウム、50mMトリスー塩酸緩衝液pH9.6で平衡化したスーパーデックス200ゲル濾過カラム（ファルマシア社製）で精製し、分子量約55kDaのインティミンNpを得た。

【0025】実施例1 抗インティミンモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作製

参考例3で調製したインティミンNpをフロイント完全アジュバントと等量混合し、BALB/cマウスの腹腔内に200 $\mu$ l（約40 $\mu$ g/マウス）投与した。約2週間の間隔をおいて更に2回、インティミンNpをフロイント不完全アジュバントと等量混合し、腹腔内に投与した。抗体価の上昇を確認した後、最終免疫としてインティミンNp約40 $\mu$ gを静脈内に投与し、その3日後に脾臓を摘出した。単離した脾細胞とマウス骨髓腫細胞株であるP3-x63-Ag8-U1（大日本製薬から購入）とを3:1の細胞数の割合で混合し、50%ポリエチレングリコール1500を用いて細胞融合を行った。細胞はHAT（ $1 \times 10^{-4}$ Mヒポキサンチン、 $4 \times 10^{-7}$ Mアミノプテリン、 $1.6 \times 10^{-5}$ Mチミン）及び10%ウシ胎仔血清添加RPMI1640培地（以下、本明細書においてHAT培地と記載する）に懸濁し、96穴のマイクロカルチャープレートに分注して培養した。ハイブリドーマが増殖してきたウェルの培養上清を以下のELISA法により調べ、インティミンに反応するモノクローナル抗体を産生しているハイブリドーマを選択した。すなわち、参考例3で調製したインティミンNpをリン酸緩衝液（以下、本明細書においてPBSと記載する）で希釈し、96穴ELISAプレートに分注し、4℃で一晩放置して固相に結合させた。次に、0.05%ツイーン20を含むPBS（以下、本明細書においてPBSTと記載する）で洗浄した後、1%スキムミルクを含むPBSを分注し、1時間、37℃に放置してブロッキングした。PBSTで洗浄後、ハイブリドーマの培養上清を分注し、1時間、37℃に放置した。続いて同様に洗浄後、ペルオキシダーゼ（以下、本明細書においてPODと記載する）標識抗マウス免疫グロブリン抗体（ダコ社製）を1000倍希釈したものを分注し、1時間、37℃に放置した。同様の洗浄後、POD基質（ABTS-過酸化水素系）を加え、室温、10分間放置した後反応停止液を加え、405nmの吸収を測定した。陽性ウェルの細胞は限界希釈法にてクローニングした。単一コロニーを含むウェルの細胞上清の抗体活

性を上記の方法で調べ、選択、培養し、インティミンに反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマINTN202、INTN203、INTN215、INTN216及びINTN228を樹立した。これらのハイブリドーマは大量培養し、それぞれマウス腹腔内に投与し、腹水を回収した。さらに、アフィニティプロテインAマッピングIIキット（バイオラド社製）を用いて腹水より抗体を精製し、モノクローナル抗体を得た。これらの抗体をモノクローナル抗体intn202、intn203、intn215、intn216及びintn228と命名した。尚、樹立したハイブリドーマのうち、INTN215とINTN228は生命工学工業技術研究所に寄託され、その受託番号はFERM P-16729、FERM P-16730である。

【0026】実施例2 抗インティミンモノクローナル抗体の反応性

（1）発現誘導した大腸菌BL21（DE3）/pW6AeaeA900に対する反応性

参考例2と同様の方法で発現誘導させた大腸菌BL21（DE3）/pW6AeaeA900及び大腸菌BL21（DE3）をPBSで3回洗浄後、660nmで1.0のODになるようにをPBSで希釈した。これを96穴ELISAプレートに分注し、37℃で一晩放置して乾固させた。次に、PBSTで洗浄した後、1%スキムミルクを含むPBSを加え、37℃で1時間ブロッキングした。PBSTで洗浄後、1%BSA-PBSで2 $\mu$ g/mlに希釈した抗インティミンモノクローナル抗体intn202、intn203、intn215、intn216、intn228及び陰性コントロール抗体としてインティミンに反応しないモノクローナル抗体をそれぞれ加え、37℃で1時間反応させた。続いて同様に洗浄後、1000倍希釈したPOD標識抗マウス免疫グロブリン抗体（ダコ社製）を加え、37℃で1時間反応させた。同様の洗浄後、POD基質（ABTS-過酸化水素系）を加え、室温、10分間放置した後反応停止液を加え、405nmの吸収を測定した。結果を表1に示す。抗インティミンモノクローナル抗体intn202、intn203、intn215、intn216及びintn228は通常の大腸菌BL21（DE3）には反応しないが、インティミン900を発現させた大腸菌BL21（DE3）/pW6AeaeA900には反応することが確認できた。

【0027】

【表1】



(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	F I	
C 0 7 K 16/12		C 0 7 K 16/12	
C 1 2 N 5/10		C 1 2 P 21/08	
15/02		G 0 1 N 33/569	F
C 1 2 P 21/08		33/577	B
G 0 1 N 33/569		C 1 2 N 5/00	B
審査請求 未請求 請求項の数 9 F D (全 12 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平10-101887	(71) 出願人	590002404 技術研究組合医療福祉機器研究所 東京都港区芝公園 3 丁目 5 番 8 号
(22) 出願日	平成10年(1998) 3 月31日	(72) 発明者	白川 貴志 東京都中央区日本橋浜町 2 丁目62番 5 号 富士レビオ株式会社内
		(72) 発明者	竹村 史典 東京都中央区日本橋浜町 2 丁目62番 5 号 富士レビオ株式会社内
		(72) 発明者	松井 利生 東京都中央区日本橋浜町 2 丁目62番 5 号 富士レビオ株式会社内
		(74) 代理人	弁理士 下坂 スミ子
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 病原性大腸菌を認識するモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ及び該モノクローナル抗体を用いた病原性大腸菌の検出方法

(57) 【要約】

【構成】 病原性大腸菌、好ましくは腸管出血性大腸菌、更に好ましくはベロ毒素を産生する腸管出血性大腸菌、特に好ましくはインティミンを有する腸管出血性大腸菌を認識するモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ及び該モノクローナル応対を用いた病原性大腸菌の検出方法。

【効果】 本発明により、病原性大腸菌を認識するモノクローナル抗体を提供し、多量検体測定にも迅速に対応できる免疫測定方法による病原性大腸菌の測定方法の他、病原性大腸菌の集菌や排除等幅広い応用方法を提供することができる。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 病原性大腸菌を認識するモノクローナル抗体。

【請求項2】 病原性大腸菌が腸管出血性大腸菌である請求項1に記載のモノクローナル抗体。

【請求項3】 病原性大腸菌がペロ毒素を産生する大腸菌である請求項1または2に記載のモノクローナル抗体。

【請求項4】 認識部位がインティミンである請求項1ないし3のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

【請求項5】 モノクローナル抗体がintn202、intn203、intn215、intn216及びintn228である請求項1ないし4のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

【請求項6】 請求項1ないし5のいずれかに記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項7】 ハイブリドーマがINTN202、INTN203、INTN215、INTN216及びINTN228である請求項6に記載のハイブリドーマ。

【請求項8】 請求項1ないし5のいずれかに記載のモノクローナル抗体を用いた病原性大腸菌の検出方法。

【請求項9】 検出方法が免疫測定方法である請求項8に記載の検出方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、病原性大腸菌に特異的なモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ及び該モノクローナル抗体を用いた病原性大腸菌の検出方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】1996年、日本では、病原性大腸菌O-157による食中毒が散発し、死亡者も含めて患者数は9000人にも上がった。病原性大腸菌O-157は、腸管出血性大腸菌の一種で、赤痢菌の毒素に類似したペロ毒素を産生し、出血性大腸炎や溶血性尿毒症症候群等を引き起こす。重症となった場合は死亡率が高いため、感染初期での確定診断や早期治療等が必須である。

【0003】しかしながら、病原性大腸菌、特にO-157の検出手段としては、O-157がソルビトール非分解性または遅分解性である性質を利用したソルビトール添加の選択培地にて、患者検体を培養するという古典的な方法が一般的に取られており、時間と手間を要するため、緊急の検査には間に合わないことがあった。また、患者からの臨床分離株では、ペロ毒素産生株としてO-157ばかりではなく、O-26やO-111が散発している事が報告され (Acta Paediatr. Jpn.:37, 469-473, (1995)、日本臨牀:55, 651-654, (1997))、大腸菌培養にO-157選択培地を用いる培養では、他の菌株の検出には問題を生じる可能性が危惧される。

【0004】一方、培養法における選択培地の問題を解

消するために、大腸菌膜表面の糖鎖によって大腸菌のO抗原型を判別する方法も取られてきた。すなわち、膜表面に存在する糖鎖に対する抗血清を用い、培養によって増殖させた大腸菌との反応の有無によりO抗原型の同定を行うものである。この方法によれば、選択培地を用いる方法よりは正確に同定することができるものの、170種類以上が知られているO抗原型別分類のうち日本国内で市販されているO抗原型別抗血清は40種程度であり、非常に数多くの株に対応した抗血清を常備しておく事は、抗血清の特異性、再現性、費用等の面で問題が多い。また、この方法を用いた場合でも、感度の点で大腸菌の培養が必要となるため、迅速な対応を必要とする毒素産生病原性大腸菌の同定には不向きであった。

【0005】近年では、ペロ毒素産生の有無を検出するために、ペロ毒素遺伝子のPCR法による遺伝子増幅法も用いられている。PCR法による遺伝子増幅は、検出感度は優れているものの、疑似遺伝子の増幅等による疑陽性を防ぐためには、検体の前処理を必要とするため、多数検体の測定に当たっては煩雑さが否めない。また、前培養後にO-157に対する抗血清を固定した磁性粒子を用いて、大腸菌O-157だけを検体中から集菌し、選択的にO-157を検出する方法も確立された

(J. Med. Microbiol.: 40, 424-427, (1994)、J. Med. Microbiol.: 44, 267-271, (1996)、Appl. Environ. Microbiol.: 62, 587-592, (1996))。しかしながら、上述したように大腸菌O-157だけがペロ毒素産生株では無く、抗血清の特異性にも問題があるため、より広くかつ見逃しの無い反応性を持った病原性大腸菌の検出方法が望まれていた (日本臨牀:55, 651-654 (1997))。

【0006】これらの方法は、O抗原による型分類別の病原性大腸菌を検出するものであるが、他方では、病原性大腸菌に共通する構造を認識する抗体を作製し、ペロ毒素を産生する危険性の高い病原性大腸菌を一括して検出しようとする試みもなされ、その中でも腸管出血性大腸菌の外膜蛋白質であるインティミンが注目されている。インティミンは、大腸粘膜の腸管粘膜上皮細胞に強い粘着性を示す粘着因子として知られており、腸管出血性大腸菌はこのインティミンを介して腸管粘膜上皮細胞に取り付き、AE障害 (Attaching & Effacing) と呼ばれる一連の細胞骨格構造障害を引き起こして、感染を成立させる。

【0007】しかしながら、感染部位への粘着因子として作用するインティミンは、O抗原型毎の構造が解明されつつある段階で、未だその全容が明らかにはなっていない。M.Louie等のグループは、O-157のインティミンのC末端側266アミノ酸残基をGSTと融合させた蛋白質を発現させ、これを免疫原として作製した抗血清により、O-5、O-26、O-55、O-111、O-127、O-157等の種々の大腸菌の交差反応性



を認めたとする報告 (Infect. Immun., 61, 4085 - 4092 (1993)) をしている。

【0008】一方で、ヒトへの感染株として恐れられているO-157 (EHEC) のインティミンと兎への感染株として最も良く解明されているO-127 (EPEC) のインティミンとを比較すると、インティミンのC末端側は非常に変異が激しく株特異的な配列を有しており、N末端側は比較的高いホモロジーが高い領域が存在している事が推測される。T.S. Agin等のグループも、O-26とO-111のインティミンの遺伝子解析において、株特異的なC末端領域の解析を試みており、N末端領域に関する遺伝子解析はなされていない (Infect. Immun., 65, 320 - 326 (1997))。

【0009】これらの報告では、インティミンを用いた場合の病原性大腸菌の共通認識部位が明らかではなく、また、抗血清は量が限られるため、研究材料としても充分ではなかった。よって、病原性大腸菌を広く認識し、集団感染の検査においても潤沢に再現性良く供給し得るようなモノクローナル抗体を作製することが望まれていた。

#### 【0010】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的は、病原性大腸菌を直接認識できるようなモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ及び該モノクローナル抗体を用いた病原性大腸菌の免疫測定方法を提供することにある。

#### 【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、従来の課題を解決すべく、病原性大腸菌に関する研究を重ねた結果、ペロ毒素を産生する主な病原性大腸菌のインティミンを共通に認識するモノクローナル抗体を作成し、該モノクローナル抗体を用いた免疫測定方法により病原性大腸菌の免疫測定をする事に成功して本発明を完成した。すなわち、本発明は、病原性大腸菌を認識するモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ及び該モノクローナル抗体を用いた病原性大腸菌の免疫測定方法を提供するものである。

【0012】本発明のモノクローナル抗体を用いれば、病原性大腸菌を短時間で直接検出する事ができ、病原性大腸菌感染の確定診断、食中毒発生の原因解明等に広く応用する事が出来る他、不溶性物質等に固定化したモノクローナル抗体を用いた腸管出血性大腸菌の集菌或いは体内からの排除等の病原性大腸菌感染後の対応にも応用することが出来る。

【0013】以下、本発明を詳細に説明する。本発明に於て病原性大腸菌とは、腸管病原性大腸菌 (EPEC)、腸管毒素原性大腸菌 (ETEC)、腸管侵入性大腸菌 (EIEC)、腸管出血性大腸菌 (EHEC)、腸管凝集性大腸菌 (EAggEC) 等の病気を引き起こす大腸菌を言い、好ましくは腸管出血性大腸菌、更に好ま

しくはペロ毒素を産生する腸管出血性大腸菌、特に好ましくは外膜蛋白質としてインティミンを有する大腸菌を意味する。

【0014】ペロ毒素を産生する大腸菌としては、O-2、O-5、O-8、O-22、O-26、O-38、O-69、O-84、O-98、O-103、O-111、O-113、O-116、O-132、O-145、O-153、O-156、O-157等、インティミンを有する大腸菌としては、O-5、O-26、O-69、O-84、O-98、O-103、O-111、O-145、O-156、O-157等が挙げられる。これら病原性大腸菌はウシを媒体としてヒトに感染すると考えられているが、ヒトから臨床分離された病原性大腸菌株のほとんどは、インティミンを有していると言う見方もある。

【0015】大腸菌O-157のインティミンの分子量は、94～97kDaで、その塩基配列はG. BeebakheeやJ. Yue & J. B. Kaper等によって明らかにされている (FEMS Microbiol. Lett.: 91, 63-68, (1992), Mol. Microbiol.: 6, 411-417, (1992))。また、これまでに牛から単離された腸管出血性大腸菌株について、インティミンの遺伝子である *eaeA* gene の有無を検討した報告もなされている (Epidemiol. Infect., 116, 1 - 7 (1996))。

【0016】病原性大腸菌を認識するモノクローナル抗体を取得するには、免疫原として、病原性大腸菌体そのものを用いても良いが、病原性大腸菌の特異的外膜蛋白質であるインティミンを用いることが望ましい。免疫原としてのインティミンは、その全体を用いても、一部分を用いてもよいが、どのような免疫原として用いたとしても、モノクローナル抗体を確立する際にインティミンに特異的なモノクローナル抗体を選別すればよく、免疫原はこれらに限定されるものではない。

【0017】上記のような免疫原を、マウス、ラット、ハムスター等の免疫動物に免疫する。免疫は常法に従って行うことができ、免疫原は単独またはアジュバンドと共に免疫動物に投与する。免疫後は、血清を採取して抗体価の上昇を確認し、必要に応じて追加免疫を行うとよい。抗体価の上昇を確認後、脾臓細胞等のような抗体産生細胞と、ミエローマ細胞のような腫瘍細胞とを、ポリエチレングリコール等のような融合剤で融合してハイブリドーマを作製する。次いでハイブリドーマをHAT培地のような選択培地を用いて選択し、限界希釈法等の適当な方法でモノクローナル化して培養する。この培養上清を酵素免疫測定法のような適当な免疫測定法で分析し、目的とする病原性大腸菌に特異的なモノクローナル抗体を産生しているクローンを選択する。選択の際には、インティミン、病原性大腸菌、病原性を示さない大腸菌等の反応性の有無を基準にして選択することが好ましい。



【0018】これらのモノクローナル抗体作製の手法は、公知の方法、例えば、ケーラーとミルシュタイン (Nature 256 495 1975)、シェーラー (Nature 285 446 1980) 等の方法により行うことができる。また上述の手法により作製したモノクローナル抗体は、プリスタン処理したマウスに該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを投与して得られた腹水、あるいは該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの培養上清から、塩析、イオン交換クロマトグラフィー、プロテインAを固定化したアフィニティークロマトグラフィー等の分析・精製手段により回収することができる。

【0019】本発明のモノクローナル抗体は、病原性大腸菌の検出方法に様々に用いることができる。例えば、大腸菌の集菌、免疫測定方法等である。検出方法が集菌の場合は、例えば本願発明のモノクローナル抗体を不溶性担体等に固定化し、モノクローナル抗体を介して不溶化された病原性大腸菌を不溶性担体ごと集めることができる。これを体内にて行えば、感染した体内から病原性大腸菌のみを排除することもできる。

【0020】検出方法が免疫測定方法の場合は、公知の免疫測定方法に用いることができる。例えば、本発明のモノクローナル抗体を蛍光標識した組織免疫染色法、ウェスタンブロット法、本発明のモノクローナル抗体を2種類用いたサンドイッチ免疫測定法、本発明のモノクローナル抗体と抗大腸菌抗体とを用いたサンドイッチ免疫測定法、標識インティミンを用いた競合免疫測定法等を挙げることができるが、本発明の免疫測定法はこれらに限定されるものではない。なお、測定する検体には制限が無く、例えば便、組織抽出液、組織、食品、血清等の病原性大腸菌の測定に適用できる。

#### 【0021】

【実施例】本発明を以下参考例及び実施例により更に詳細に説明する。

参考例1 病原性大腸菌O-157からのインティミン遺伝子の単離並びにその解析

報告されているインティミン遺伝子の塩基配列 (FEMS Microbiol. Lett.:91,63-68, (1992)) を参考にして、O-157ゲノムDNAを鋳型として用いてPCR法にてインティミン遺伝子32aa-935aa領域を増幅した。増幅した断片は、制限酵素EcoRIとHindIIIで水解した後、図1に示す発現用プラスミドpW6AのEcoRI-HindIII部位に挿入し、プラスミドpW6AeaeA900を作製した。挿入されたDNA断片の塩基配列を調べたところ、配列番号1に示すDNA配列を有し、該DNA配列は配列番号1に示すアミノ酸配列をコードしていた。さらにプラスミドpW6AeaeA900を鋳型としてPCR法にてインティミン遺伝子の38aa-522aa領域を増幅した。増幅した断片は制限酵素EcoRIとBamHIで水解した後、発現用プラスミドpW6AのEcoRI-Bam

HI部位に挿入し、プラスミドpW6AeaeANpを作製した。次いでpW6AeaeA900とpW6AeaeANpをそれぞれ用いて、大腸菌BL21 (DE3) (Brookhaven National Laboratoryより入手) を形質転換させ、インティミンポリペプチド32aa-935aa及び38aa-522aaを発現するアンピシリン耐性の形質転換体大腸菌BL21 (DE3)/pW6AeaeA900とBL21 (DE3)/pW6AeaeANpを得た。

#### 【0022】参考例2 組換え蛋白質の発現と解析

参考例1で作製した形質転換体を、50μg/mlのアンピシリンを含むLB培地2ml中37℃で培養した。予備培養にて600nmでODを0.6~0.8にした後、0.5mM IPTGを添加し発現誘導をおこない、さらに2時間培養した。1.5ml量の菌体培養液を5000rpmで2分間遠心分離して菌体を集め、100μlの緩衝液(10mMトリス-塩酸pH8.0、0.1M塩化ナトリウム、1mM EDTA)に懸濁し、15分間の超音波破碎により完全に菌体を破碎した。これを菌体試料とする。

【0023】菌体試料8μlに3倍濃度のポリアクリルアミドゲル緩衝液(0.1Mトリス塩酸pH6.8、6% SDS、24%グリセリン、6mM EDTA、3% 2-メルカプトエタノール、0.01%BPB)4μlを加え、十分攪拌した後、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。泳動後ポリアクリルアミドゲルをタンパク染色し、菌体試料に含まれるタンパクの展開像を観察した。形質転換体BL21 (DE3)/pW6AeaeA900及びBL21 (DE3)/pW6AeaeANp試料中には、非形質転換体BL21 (DE3)では認められない分子量約94~97kDa及び約55kDaのポリペプチドが存在した。これはプラスミドpW6AeaeA900及びpW6AeaeANpからの発現産物と考えられる。発現産物はそれぞれインティミン900及びインティミンNpと名付けた。

#### 【0024】参考例3 インティミンNpの精製

大腸菌BL21 (DE3)/pW6AeaeANpをLB培地37℃条件下で培養した。予備培養にて600nmでODを約0.7の濃度にした後、0.5mM IPTGを添加し発現誘導を行った。4時間培養後、遠心を行い大腸菌を回収した。回収した大腸菌に50mMトリス-塩酸緩衝液pH8.0、2M尿素を200ml加え、氷冷下で超音波破碎処理を行った。発現したインティミンNpは、遠心後不溶性画分に回収された。不溶性画分を6M尿素、20mM水酸化ナトリウム溶液pH12.0で可溶化し直ちに1.0Mトリス-塩酸緩衝液pH8.0を添加してpH9.0とし遠心を行い上清画分を回収した。この上清を、6M尿素、50mMトリス-塩酸緩衝液pH9.0で平衡化したQFF陰イオン交換カラム(ファルマシア社製)でイオン交換精製した。塩



モノクローナル抗体	吸光度 A405	
	BL21(DE3)/pW6AaaaA900	BL21(DE3)
intn202	1.865	0.062
intn203	1.560	0.056
intn215	1.913	0.049
intn216	1.924	0.053
intn228	1.699	0.075
陰性コントロール抗体	0.064	0.053

【0028】(2) ウエスタンブロットによる病原性大腸菌O-157、O-26、O-111に対する反応性の確認

病原性大腸菌O-157、O-26、O-111及び遺伝子工学の分野で用いられている大腸菌DH5 $\alpha$ 、BL21(DE3)をLB培地で37℃一晩培養した。1ml量の菌体培養液を5000rpmで2分間遠心分離して菌体を集め、150 $\mu$ lのポリアクリルアミドゲル緩衝液(20%グリセリン、1%SDS、10mMトリス塩酸、pH6.8、1% 2-メルカプトエタノール、0.01%BPB)に懸濁し、15分間の超音波破碎により完全に菌体を破碎した。沸騰水中で加熱した後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行い、更にニトロセルロース膜に転写した。転写膜を1%スキムミルクを含むPBSでブロッキングした後、1%BSA-PBSで2 $\mu$ g/mlに希釈した抗インティミンモノクローナル抗体intn202、intn203、intn215、intn216及びintn228を室温、1時間反応させた。PBSによる洗浄後、300倍希釈したPOD標識抗マウス免疫グロブリン抗体(ダコ社製)と室温、1時間反応させた。更にPBSTによる洗浄を行った後、POD不溶性基質(4クロロナフトール-過酸化水素系)を加えて、発色させた。結果を図2に示す。病原性大腸菌O-157、O-26、O-111では分子量94kDa付近にバンドを生じたが、大腸菌DH5 $\alpha$ 、BL21(DE3)では同様のバンドが認められなかった。抗インティミンモノクローナル抗体intn202、intn203、intn215、intn216及びintn228は病原性大腸菌O-157、O-26、O-111のインティミンに反応することが確認できた。

【0029】実施例3 抗インティミンモノクローナル抗体のエピトープ解析

(1) エピトープ解析用のペプチド作製

エピトープ解析用のペプチドとして、免疫原として用いたインティミンNpの部分ペプチドを作製した。まず、参考例1で作製したpW6AaaaANpを鋳型として用いてPCR法にて特定の部分ペプチド領域をコードする遺伝子領域を増幅した。増幅した断片は、それぞれ制限酵素EcoRIとHindIIIで水解した後、図2に示すチオレドキシン融合発現プラスミドpWT8AのEcoRI-HindIII部位に挿入した。次いで、それぞれの組み換えプラスミドを用いて、大腸菌BL21(DE3)(Brookhaven National Laboratoryより入手)を形質転換した。形質転換体は、参考例2と同様の方法でチオレドキシン融合蛋白として発現させた。発現させた特定の部分ペプチド領域は、配列表1に示すインティミンのアミノ酸番号で、38~235、237~522、158~351、38~157、158~236、38~90、91~157、82~99の計8種類である。これらの部分ペプチドは、NpA、NpB、NpC、NpD、NpF、NpH、NpI、NpNと命名した。

【0030】(2) 実施例3-(1)で作製した部分ペプチド8種類を用いて、ウエスタンブロットにより、実施例1で作製したハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体のエピトープ解析を行った。ウエスタンブロット法は、実施例3-(1)で作製した部分ペプチド8種をSDS-PAGEした他は、実施例2-(2)に記載の方法にて行った。結果を表2に示す。表2に示すように、モノクローナル抗体intn202、intn203、intn215、intn216及びintn228はいずれも、インティミンの38~157アミノ酸領域に結合することが明らかとなった。

【0031】

【表2】



	11				12			
	NpA	NpB	NpC	NpD	NpF	NpH	NpI	NpN
intn202	+	-	-	+	-	-	-	-
intn203	+	-	-	+	-	-	-	-
intn215	+	-	-	+	-	-	-	-
intn216	+	-	-	+	-	-	-	-
intn228	+	-	-	+	-	-	-	-

## 【0032】

【発明の効果】本発明により、病原性大腸菌に特異的なモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ及び該モノクローナル抗体を用いた病原

性大腸菌の免疫測定方法を提供し、病原性大腸菌を簡便に測定することができる。

## 【0033】

## 【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：2712

配列の型：核酸

トポロジー：二本鎖

配列の種類：核酸

配列

TAT GTT AAT CAG AAT TCA TTT GCA AAT GGT GAA AAT TAT TTT AAA TTG	48
Tyr Val Asn Gln Asn Ser Phe Ala Asn Gly Glu Asn Tyr Phe Lys Leu	
5 10 15	
GGT TCG GAT TCA AAA CTG TTA ACT CAT GAT AGC TAT CAG AAT CGC CTT	96
Gly Ser Asp Ser Lys Leu Leu Thr His Asp Ser Tyr Gln Asn Arg Leu	
20 25 30	
TTT TAT ACG TTG AAA ACT GGT GAA ACT GTT GCC GAT CTT TCT AAA TCG	144
Phe Tyr Thr Leu Lys Thr Gly Glu Thr Val Ala Asp Leu Ser Lys Ser	
35 40 45	
CAA GAT ATT AAT TTA TCG ACG ATT TGG TCG TTG AAT AAG CAT TTA TAC	192
Gln Asp Ile Asn Leu Ser Thr Ile Trp Ser Leu Asn Lys His Leu Tyr	
50 55 60	
AGT TCT GAA AGC GAA ATG ATG AAG GCC GCG CCT GGT CAG CAG ATC ATT	240
Ser Ser Glu Ser Glu Met Met Lys Ala Ala Pro Gly Gln Gln Ile Ile	
65 70 75 80	
TTG CCA CTC AAA AAA CTT CCC TTT GAA TAC AGT GCA CTA CCA CTT TTA	288
Leu Pro Leu Lys Lys Leu Pro Phe Glu Tyr Ser Ala Leu Pro Leu Leu	
85 90 95	
GGT TCG GCA CCT CTT GTT GCT GCA GGT GGT GTT GCT GGT CAC ACG AAT	336
Gly Ser Ala Pro Leu Val Ala Ala Gly Gly Val Ala Gly His Thr Asn	
100 105 110	
AAA CTG ACT AAA ATG TCC CCG GAC GTG ACC AAA AGC AAC ATG ACC GAT	384
Lys Leu Thr Lys Met Ser Pro Asp Val Thr Lys Ser Asn Met Thr Asp	
115 120 125	
GAC AAG GCA TTA AAT TAT GCG GCA CAA CAG GCG GCG AGT CTC GGT AGC	432
Asp Lys Ala Leu Asn Tyr Ala Ala Gln Gln Ala Ala Ser Leu Gly Ser	
130 135 140	
CAG CTT CAG TCG CGA TCT CTG AAC GGC GAT TAC GCG AAA GAT ACC GCT	480
Gln Leu Gln Ser Arg Ser Leu Asn Gly Asp Tyr Ala Lys Asp Thr Ala	
145 150 155 160	
CTT GGT ATC GCT GGT AAC CAG GCT TCG TCA CAG TTG CAG GCC TGG TTA	528
Leu Gly Ile Ala Gly Asn Gln Ala Ser Ser Gln Leu Gln Ala Trp Leu	
165 170 175	



13	14
CAA CAT TAT GGA ACG GCA GAG GTT AAT CTG CAG AGT GGT AAT AAC TTT 576	
Gln His Tyr Gly Thr Ala Glu Val Asn Leu Gln Ser Gly Asn Asn Phe	
180 185 190	
GAC GGT AGT TCA CTG GAC TTC TTA TTA CCG TTC TAT GAT TCC GAA AAA 624	
Asp Gly Ser Ser Leu Asp Phe Leu Leu Pro Phe Tyr Asp Ser Glu Lys	
195 200 205	
ATG CTG GCA TTT GGT CAG GTC GGA GCG CGT TAC ATT GAC TCC CGC TTT 672	
Met Leu Ala Phe Gly Gln Val Gly Ala Arg Tyr Ile Asp Ser Arg Phe	
210 215 220	
ACG GCA AAT TTA GGT GCG GGT CAG CGT TTT TTC CTT CCT GCA AAC ATG 720	
Thr Ala Asn Leu Gly Ala Gly Gln Arg Phe Phe Leu Pro Ala Asn Met	
225 230 235 240	
TTG GGC TAT AAC GTC TTC ATT GAT CAG GAT TTT TCT GGT GAT AAT ACC 768	
Leu Gly Tyr Asn Val Phe Ile Asp Gln Asp Phe Ser Gly Asp Asn Thr	
245 250 255	
CGT TTA GGT ATT GGT GGC GAA TAC TGG CGA GAC TAT TTC AAA AGT AGC 816	
Arg Leu Gly Ile Gly Gly Glu Tyr Trp Arg Asp Tyr Phe Lys Ser Ser	
260 265 270	
GTT AAC GGC TAT TTC CGC ATG AGC GGC TGG CAT GAG TCA TAC AAT AAG 864	
Val Asn Gly Tyr Phe Arg Met Ser Gly Trp His Glu Ser Tyr Asn Lys	
275 280 285	
AAA GAC TAT GAT GAG CGC CCA GCA AAT GGC TTC GAT ATC CGT TTT AAT 912	
Lys Asp Tyr Asp Glu Arg Pro Ala Asn Gly Phe Asp Ile Arg Phe Asn	
290 295 300	
GGC TAT CTA CCG TCA TAT CCG GCA TTA GGC GCC AAG CTG ATA TAT GAG 960	
Gly Tyr Leu Pro Ser Tyr Pro Ala Leu Gly Ala Lys Leu Ile Tyr Glu	
305 310 315 320	
CAG TAT TAT GGT GAT GAT GTT GCT TTG TTT AAT TCT GAT AAG CTG CAG 1008	
Gln Tyr Tyr Gly Asp Asp Val Ala Leu Phe Asn Ser Asp Lys Leu Gln	
325 330 335	
TCG AAT CCT GGT GCG GCG ACC GTT GGT GTA AAC TAT ACT CCG ATT CCT 1056	
Ser Asn Pro Gly Ala Ala Thr Val Gly Val Asn Tyr Thr Pro Ile Pro	
340 345 350	
CTG GTG ACG ATG GGG ATC GAT TAC CGT CAT GGT ACG GGT AAT GAA AAT 1104	
Leu Val Thr Met Gly Ile Asp Tyr Arg His Gly Thr Gly Asn Glu Asn	
355 360 365	
GAT CTC CTT TAC TCA ATG CAG TTC CGT TAT CAG TTT GAT AAA TCG TGG 1152	
Asp Leu Leu Tyr Ser Met Gln Phe Arg Tyr Gln Phe Asp Lys Ser Trp	
370 375 380	
TCT CAG CAA ATT GAA CCA CAG TAT GTT AAC GAG TTA AGA ACA TTA TCA 1200	
Ser Gln Gln Ile Glu Pro Gln Tyr Val Asn Glu Leu Arg Thr Leu Ser	
385 390 395 400	
GGC AGC CGT TAC GAT CTG GTT CAG CGT AAT AAC AAT ATT ATT CTG GAG 1248	
Gly Ser Arg Tyr Asp Leu Val Gln Arg Asn Asn Asn Ile Ile Leu Glu	
405 410 415	
TAC AAG AAG CAG GAT ATT CTT TCT CTG AAT ATT CCG CAT GAT ATT AAT 1296	
Tyr Lys Lys Gln Asp Ile Leu Ser Leu Asn Ile Pro His Asp Ile Asn	
420 425 430	
GGT ACT GAA CAC AGT ACG CAG AAG ATT CAG TTG ATC GTT AAG AGC AAA 1344	
Gly Thr Glu His Ser Thr Gln Lys Ile Gln Leu Ile Val Lys Ser Lys	



15	435	440	445	16
	TAC GGT CTG GAT CGT ATC GTC TGG GAT GAT AGT GCA TTA CGC AGT CAG	1392		
	Tyr Gly Leu Asp Arg Ile Val Trp Asp Asp Ser Ala Leu Arg Ser Gln			
	450	455	460	
	GGC GGT CAG ATT CAG CAT AGC GGA AGC CAA AGC GCA CAA GAC TAC CAG	1440		
	Gly Gly Gln Ile Gln His Ser Gly Ser Gln Ser Ala Gln Asp Tyr Gln			
	465	470	475	480
	GCT ATT TTG CCT GCT TAT GTG CAA GGT GGC AGC AAT ATT TAT AAA GTG	1488		
	Ala Ile Leu Pro Ala Tyr Val Gln Gly Gly Ser Asn Ile Tyr Lys Val			
	485	490	495	
	ACG GCT CGC GCC TAT GAC CGT AAT GGC AAT AGC TCT AAC AAT GTA CAG	1536		
	Thr Ala Arg Ala Tyr Asp Arg Asn Gly Asn Ser Ser Asn Asn Val Gln			
	500	505	510	
	CTT ACT ATT ACC GTT CTG TCG AAT GGT CAA GTT GTC GAC CAG GTT GGG	1584		
	Leu Thr Ile Thr Val Leu Ser Asn Gly Gln Val Val Asp Gln Val Gly			
	515	520	525	
	GTA ACG GAC TTT ACG GCG GAT AAG ACT TCG GCT AAA GCG GAT AAC GCC	1632		
	Val Thr Asp Phe Thr Ala Asp Lys Thr Ser Ala Lys Ala Asp Asn Ala			
	530	535	540	
	GAT ACC ATT ACT TAT ACC GCG ACG GTG AAA AAG AAT GGG GTA GCT CAG	1680		
	Asp Thr Ile Thr Tyr Thr Ala Thr Val Lys Lys Asn Gly Val Ala Gln			
	545	550	555	560
	GCT AAT GTC CCT GTT TCA TTT AAT ATT GTT TCA GGA ACT GCA ACT CTT	1728		
	Ala Asn Val Pro Val Ser Phe Asn Ile Val Ser Gly Thr Ala Thr Leu			
	565	570	575	
	GGG GCA AAT AGT GCC AAA ACG GAT GCT AAC GGT AAG GCA ACC GTA ACG	1776		
	Gly Ala Asn Ser Ala Lys Thr Asp Ala Asn Gly Lys Ala Thr Val Thr			
	580	585	590	
	TTG AAG TCG AGT ACG CCA GGA CAG GTC GTC GTG TCT GCT AAA ACC GCG	1824		
	Leu Lys Ser Ser Thr Pro Gly Gln Val Val Val Ser Ala Lys Thr Ala			
	595	600	605	
	GAG ATG ACT TCA GCA CTT AAT GCC AGT GCG GTT ATA TTT TTT GAT CAA	1872		
	Glu Met Thr Ser Ala Leu Asn Ala Ser Ala Val Ile Phe Phe Asp Gln			
	610	615	620	
	ACC AAG GCC AGC ATT ACT GAG ATT AAG GCT GAT AAG ACA ACT GCA GTA	1920		
	Thr Lys Ala Ser Ile Thr Glu Ile Lys Ala Asp Lys Thr Thr Ala Val			
	625	630	635	640
	GCA AAT GGT AAG GAT GCT ATT AAA TAT ACT GTA AAA GTT ATG AAA AAC	1968		
	Ala Asn Gly Lys Asp Ala Ile Lys Tyr Thr Val Lys Val Met Lys Asn			
	645	650	655	
	GGT CAG CCA GTT AAT AAT CAA TCC GTT ACA TTC TCA ACA AAC TTT GGG	2016		
	Gly Gln Pro Val Asn Asn Gln Ser Val Thr Phe Ser Thr Asn Phe Gly			
	660	665	670	
	ATG TTC AAC GGT AAG TCT CAA ACG CAA GCA ACC ACG GGA AAT GAT GGT	2064		
	Met Phe Asn Gly Lys Ser Gln Thr Gln Ala Thr Thr Gly Asn Asp Gly			
	675	680	685	
	CGT GCG ACG ATA ACA CTA ACT TCC AGT TCC GCC GGT AAA GCG ACT GTT	2112		
	Arg Ala Thr Ile Thr Leu Thr Ser Ser Ser Ala Gly Lys Ala Thr Val			
	690	695	700	
	AGT GCG ACA GTC AGT GAT GGG GCT GAG GTT AAA GCG ACT GAG GTC ACT	2160		



17	18
Ser Ala Thr Val Ser Asp Gly Ala Glu Val Lys Ala Thr Glu Val Thr	
705	710 715 720
TTT TTT GAT GAA CTG AAA ATT GAC AAC AAG GTT GAT ATT ATT GGT AAC	2208
Phe Phe Asp Glu Leu Lys Ile Asp Asn Lys Val Asp Ile Ile Gly Asn	
725	730 735
AAT GTC AAG AGG TCG ATG TTG CCT AAT ATT TGG CTG CAA TAT GGT CAG	2256
Asn Val Lys Arg Ser Met Leu Pro Asn Ile Trp Leu Gln Tyr Gly Gln	
740	745 750
TTT AAA CTG AAA GCA AGC GGT GGT GAT GGT ACA TAT TCA TGG TAT TCA	2304
Phe Lys Leu Lys Ala Ser Gly Gly Asp Gly Thr Tyr Ser Trp Tyr Ser	
755	760 765
GAA AAT ACC AGT ATC GCG ACT GTC GAT GCA TCA GGG AAA GTC ACT TTG	2352
Glu Asn Thr Ser Ile Ala Thr Val Asp Ala Ser Gly Lys Val Thr Leu	
770	775 780
AAT GGT AAA GGC AGT GTC GTA ATT AAA GCC ACA TCT GGT GAT AAG CAA	2400
Asn Gly Lys Gly Ser Val Val Ile Lys Ala Thr Ser Gly Asp Lys Gln	
785	790 795 800
ACA GTA AGT TAC ACT ATA AAA GCA CCG TCG TAT ATG ATA AAA GTG GAT	2448
Thr Val Ser Tyr Thr Ile Lys Ala Pro Ser Tyr Met Ile Lys Val Asp	
805	810 815
AAG CAA GCC TAT TAT GCT GAT GCT ATG TCC ATT TGC AAA AAT TTA TTA	2496
Lys Gln Ala Tyr Tyr Ala Asp Ala Met Ser Ile Cys Lys Asn Leu Leu	
820	825 830
CCA TCC ACA CAG ACG GTA TTG TCA GAT ATT TAT GAC TCA TGG GGG GCT	2544
Pro Ser Thr Gln Thr Val Leu Ser Asp Ile Tyr Asp Ser Trp Gly Ala	
835	840 845
GCA AAT AAA TAT AGC CAT TAT AGT TCT ATG AAC TCA ATA ACT GCT TGG	2592
Ala Asn Lys Tyr Ser His Tyr Ser Ser Met Asn Ser Ile Thr Ala Trp	
850	855 860
ATT AAA CAG ACA TCT AGT GAG CAG CGT TCT GGA GTA TCA AGC ACT TAT	2640
Ile Lys Gln Thr Ser Ser Glu Gln Arg Ser Gly Val Ser Ser Thr Tyr	
865	870 875 880
AAC CTA ATA ACA CAA AAC CCT CTT CCT GGG GTT AAT GTT AAT ACT CCA	2688
Asn Leu Ile Thr Gln Asn Pro Leu Pro Gly Val Asn Val Asn Thr Pro	
885	890 895
AAT GTC TAT GCG GTT TGT GTA GAA	2712
Asn Val Tyr Ala Val Cys Val Glu	
900	

【図面の簡単な説明】

【図 1】発現用プラスミド pW6A の制限酵素地図である。

【図 2】発現用プラスミド pWT.8A の制限酵素地図で

ある。

【図 3】ウエスタンブロットによる病原性大腸菌 O-157、O-26、O-111 の測定結果を示す図である。



【図1】

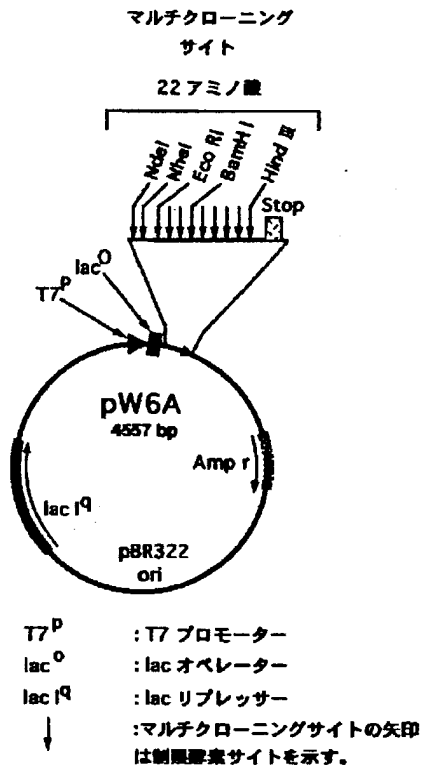
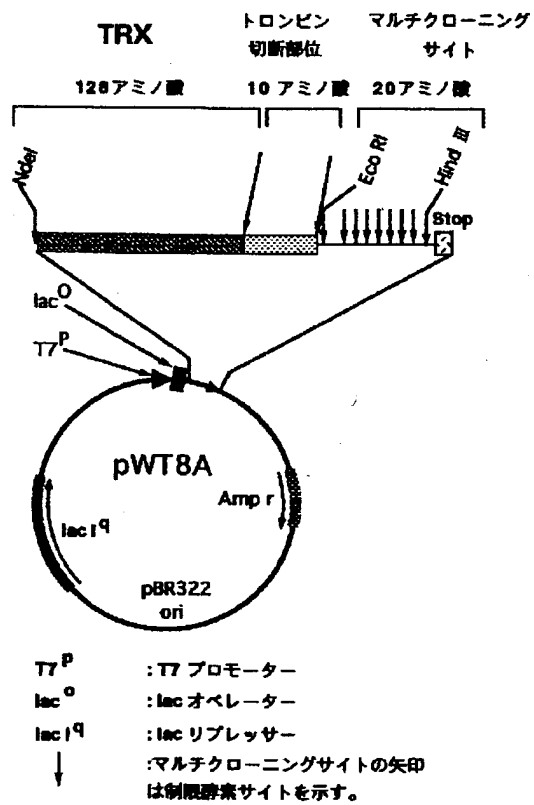
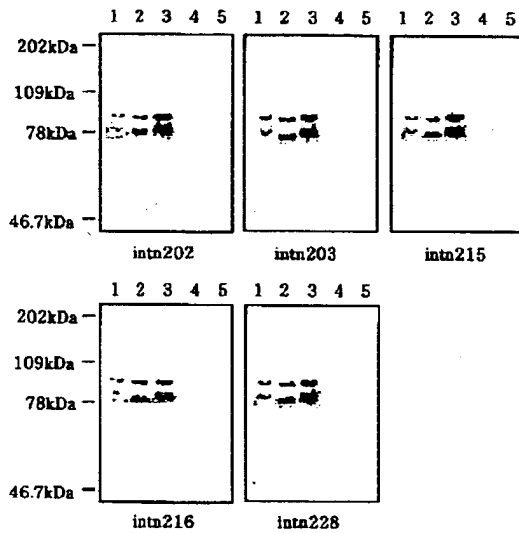


図1. 発現ベクターpW6A

【図2】



【図3】



レーン1: O157, レーン2: O26, レーン3: O111,  
レーン4: BL21 (DE3), レーン5: DH5。



フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>                      識別記号  
    G 0 1 N    33/577  
  //(C 1 2 N    5/10  
    C 1 2 R    1:91)

F I  
C 1 2 N    15/00                      C

(72) 発明者    上野   英一  
                東京都中央区日本橋浜町 2 丁目 62 番 5 号  
                富士レビオ株式会社内

(72) 発明者    伊藤   哲  
                東京都中央区日本橋浜町 2 丁目 62 番 5 号  
                富士レビオ株式会社内